



TITLE:

A-674563 increases chondrocyte marker expression in cultured chondrocytes by inhibiting Sox9 degradation(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Kobayashi, Tomohito

CITATION:

Kobayashi, Tomohito. A-674563 increases chondrocyte marker expression in cultured chondrocytes by inhibiting Sox9 degradation. 京都大学, 2018, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21012>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏 名	小 林 与 人
論文題目	A-674563 increases chondrocyte marker expression in cultured chondrocytes by inhibiting Sox9 degradation (A-674563 は Sox9 蛋白質の分解を抑制することにより培養軟骨細胞の軟骨マーカーの発現を増加させる)		
(論文内容の要旨)			
<p>関節軟骨は骨の端を覆い、円滑な関節運動を担っている。関節軟骨の自己修復能は限られており、外傷や炎症などで損傷すると、自然修復は困難である。関節軟骨損傷に対する治療方法として、非荷重部の軟骨を採取し軟骨細胞の単層培養を行い、細胞数を増加させてから欠損部に移植する自家培養軟骨細胞移植が行われている。しかしながら、軟骨細胞は培養してその数を増やすと変質して軟骨の性質を失うため、自家培養軟骨移植の効果は限られている。それゆえ、軟骨細胞の性質を維持しつつ、細胞数を増やすような培養方法を開発することが望まれている。</p> <p>本研究では、まず軟骨細胞の脱分化を抑制しうる低分子化合物を探索するスクリーニング系を確立した。290-2-14 細胞株はドキシサイクリン（Dox）存在下に Sox9 遺伝子、Klf4 遺伝子、c-Myc 遺伝子が発現し、軟骨細胞様細胞へとリプログラムされる。また、軟骨特異的 XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子プロモーター下に EGFP を発現するレポーターが組み込まれており、軟骨細胞形質を獲得すると蛍光を発する。この細胞を Dox 非存在下で培養して脱分化させた後、種々の低分子化合物を添加して培養し、蛍光を観察した。5822 個の低分子化合物のスクリーニングを行い、蛍光を増強する化合物として A-674563 を得た。</p> <p>A-674563 を初代軟骨細胞培養に添加したところ、II 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子、XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子、アグリカン遺伝子などの軟骨細胞マーカー遺伝子の mRNA 発現を有意に上昇させた。これらの軟骨細胞マーカー遺伝子の転写は、転写因子である Sox9 によって活性化されるが、A-674563 は Sox9 遺伝子の mRNA 発現を上昇させなかった。一方、A-674563 は、Sox9 蛋白質を増加させた。軟骨細胞培養に A-674563 を加えた後、シクロヘキシミドを加えて蛋白質の合成を阻害したところ、Sox9 蛋白質の減少が抑制された。このことから、A-674563 は Sox9 蛋白質の分解を抑制することで Sox9 蛋白質を増加させたと考えた。また、オートファジー経路阻害剤である BafilomycinA1 を培養軟骨細胞に加えたところ Sox9 蛋白質の量は変わらなかったが、ユビキチン-プロテアソーム経路阻害剤である MG132 を加えたところ Sox9 蛋白質が増加したことから、Sox9 蛋白質がユビキチン-プロテアソーム経路で分解されることが示唆された。</p> <p>トランスクリプトーム解析を行ったところ、A-674563 は Usp29 (ubiquitin-specific peptidase 29) 遺伝子の発現を上昇させていた。定量リアルタイム RT-PCR でも同様の結果を確認した。USP29 は脱ユビキチン化を通して種々の蛋白質の分解抑制に働くことが報告されており、Sox9 蛋白質の分解抑制にもかかわっている可能性があることを推測した。A-674563 は Sox9 蛋白質の分解抑制を通して単層培養における軟骨細胞の脱分化を抑制し、自家培養軟骨細胞移植において軟骨細胞の性質を維持するために有効である可能性が示唆された。詳細なメカニズム解析は今後の課題である。この成果は、自家軟骨細胞移植術における細胞供給の課題の解決に貢献しうる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)
関節軟骨損傷の治療法のひとつとして自家培養軟骨細胞移植術がある。しかし、軟骨細胞は培養してその数を増やすと変質して軟骨の性質を失うため、軟骨細胞の性質を維持して細胞数を増やす培養方法を開発することが望まれている。
本研究では、5822 個の低分子化合物をスクリーニングし、培養軟骨細胞において II 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖遺伝子、XI 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子、アグリカン遺伝子などの軟骨細胞マーカー遺伝子の mRNA 発現を有意に上昇させる化合物として A-674563 を得た。これらの軟骨細胞マーカー遺伝子の転写を活性化させる因子である Sox9 遺伝子の mRNA 発現は A-674563 によって上昇しなかった。シクロヘキシミド、BafilomycinA1、MG132 を使用した実験を行った結果、Sox9 蛋白質はユビキチン-プロテアソーム経路で分解されること、A-674563 が Sox9 蛋白質分解を抑制して Sox9 蛋白質を増加させることを示唆する結果を得た。トランスクリプトーム解析を行ったところ、A-674563 は蛋白質の脱ユビキチン化を促進する Usp29 (ubiquitin-specific peptidase 29) 遺伝子の発現を上昇させていた。
A-674563 は Sox9 蛋白質の分解抑制を通して軟骨細胞の脱分化を抑制し、自家培養軟骨細胞移植において軟骨細胞の性質を維持するために有効である可能性が示唆された。
以上の研究は、自家軟骨細胞移植術における細胞供給の課題の解決に貢献しうる。
したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。
なお、本学位授与申請者は、平成 3 0 年 2 月 1 9 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。